

The role of K-ras point mutation detection in lung cancer : towards a strategy for early detection

Citation for published version (APA):

Somers, V. A. M. C. (1998). *The role of K-ras point mutation detection in lung cancer : towards a strategy for early detection*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19990121vs>

Document status and date:

Published: 01/01/1998

DOI:

[10.26481/dis.19990121vs](https://doi.org/10.26481/dis.19990121vs)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 06 May. 2023

Summary

Lung cancer has a high incidence and mortality. Early detection programs with conventional methods such as X-ray and sputum cytology have failed to improve mortality. Lung carcinomas are now considered as a genetic disease. Many regions in the genome have been thought to contain candidate genes related to the development of lung cancer. The mutations in p53 and K-ras genes are the best characterized in lung cancer and are thought to occur late in the development of lung cancer. Therefore, new approaches that use genetic alterations such as K-ras as potential biomarkers may be beneficial for early detection of lung cancer.

Previously, several molecular methods have been utilized for the detection of K-ras point mutations in lung cancer. However, difficulties in critical analytic steps following DNA amplification have prevented the technology from being more widely applied in clinical laboratories and the biotechnology industry.

For early detection of K-ras mutations in a heterogeneous cell population such as sputum or bronchial wash specimens, where only a small fraction of tumor cells containing the mutation are present among much larger numbers of genetically normal cells, a highly sensitive technique is required, which should be very specific but not time-consuming, technically simple and safe.

Chapter One comprises a general introduction to the field of study. Highlighted are genetic alterations occurring in the multistep process of lung cancer development. It also presents a historical overview on the subject of lung cancer screening. The aims of the present study are further discussed.

Chapter Two describes the technological development of a new technique, Point- EXACCT, for detecting the presence of a specific nucleotide sequence within a double-stranded DNA in a sample comprising: a. digestion of the double-stranded DNA with an exonuclease which converts at least a portion of the double-stranded DNA to single-stranded DNA; b. hybridization of the single-stranded DNA with i) a first probe adapted with biotin which can be captured to a solid support (streptavidin), and ii) a second probe labeled with digoxigenin which can hybridize with the single-stranded DNA adjacent to the hybridized first probe; c. capturing the biotin on the first probe hybridized to the DNA to the streptavidin; d. ligation of the hybridized first and second probes in cases of perfect complementarity between probes and template DNA; e. denaturation of the ligated first and second probes from the hybridized single-stranded DNA; f. removal of uncaptured labeled digoxigenin probe; and g. detection the presence of captured detectable digoxigenin, which indicates the presence of the specific nucleotide sequence within the double-stranded DNA in the sample.

Solution hybridization is an essential step in sequencing and some point mutation detection methods. In practice this hybridization is hampered resulting in the need of additional purification of amplification products. In **Chapter Three**, the effect of pretreatment with exonuclease on different point mutation detection methods is analyzed. With the use of exonuclease, the detection of heterozygosity using fluorescent cycle sequencing is becoming more reliable. The high sensitivity of Point-EXACCT due to the use of exonuclease makes it a highly promising method for large-scale screening of (pre)malignant changes in patients with a high risk for cancer development.

In **Chapter Four**, the Point-EXACCT method is validated for detection of K-ras point mutations in a large series of NSCLC samples by comparing the results obtained with Point-EXACCT with two sequencing methods. For the analysis of mutations occurring at either a high or low mutant fraction in K-ras codon 12, we have demonstrated an increased number of mutations found with Point-EXACCT compared with traditional methods such as sequencing. The finding of K-ras mutations in squamous cell carcinomas is explained by the high sensitivity of the Point-EXACCT method. Therefore, Point-EXACCT may be applicable for detection of those alterations occurring at a low frequency among an excess of cells with wild type DNA.

In **Chapter Five**, using the Point-EXACCT assay for identification of K-ras alterations in archival sputum specimens derived from patients who were diagnosed with lung cancer, the role of the K-ras gene as an early marker in lung cancer is investigated. DNA from paraffin-embedded adenocarcinoma and corresponding sputum samples of 22 patients was analyzed for mutations of the K-ras gene. A mutation in K-ras codon 12 was shown in more than half of the tumor samples, and in 45% of the patients with a K-ras mutation in the tumor, the same type of mutation was identified in at least one sputum sample. No K-ras alterations were found in sputum samples from patients with a K-ras negative tumor. Time between K-ras point mutation detection in sputum and clinical diagnosis of lung cancer varied from one month to almost 4 years. From this study we conclude that Point-EXACCT is suitable for detection of K-ras point mutations in sputum samples of patients with adenocarcinoma of the lung. This procedure may be an important adjunct to cytology in the early diagnosis of lung cancer since K-ras point mutations were found in sputum specimens that were diagnosed negative for malignancy by cytological analysis.

Chapter Six investigates whether K-ras point mutations also occur in nonmalignant bronchial epithelium. To this end, the bronchial epithelium of 75 patients who were treated for NSCLC with curative surgery was analyzed for the presence of K-ras point mutations. Analysis was performed on both tumor specimens and nonmalignant bronchial brushes obtained from an area distant from the tumor location. The finding of K-ras alterations in tumor specimens but not in normal bronchial epithelial cells collected at distant areas from the tumor supports the hypothesis that the occurrence of K-ras point mutations is

specifically related to tumor. These data may lead to a refinement of the concept of field cancerization and may suggest that a preferential susceptibility of certain cell types may exist for specific carcinogens.

In **Chapter Seven**, the additional diagnostic value of K-ras point mutations in bronchial wash specimens of patients under suspicion of lung cancer is studied. A consecutive series of bronchial wash specimens without a cytologic diagnosis of malignancy was investigated with Point-EXACCT in patients with abnormalities on X-ray and in a control group. Point mutation analysis of K-ras codon 12 with Point-EXACCT was performed in bronchial wash specimens and corresponding tumor tissues, if available. With Point-EXACCT K-ras alterations were identified in 21% bronchial wash specimens without a decisive diagnosis of malignancy. No K-ras codon 12 alterations were identified in bronchial wash specimens of patients without lung cancer. The presence of K-ras alterations in bronchial wash specimens is clinically useful in diagnosis of peripheral tumors and molecular analysis can serve as an important adjunct to bronchoscopy in lung cancer diagnosis.

In **Chapter Eight** the prognostic value of specific K-ras genotypes in patients with NSCLC is examined. Associations of K-ras point mutations with clinical characteristics and survival were studied. Survival analysis showed prognostic significance of K-ras alterations on disease free survival and an adverse effect of K-ras mutations on overall survival of patients with pathological stage II and IIIA tumors. The substitution of the wild type GGT (glycine) to GAT (aspartic acid) and ATT (isoleucine) appeared to be a mutation type showing significantly worse prognosis compared with the wild type or other K-ras point mutations. We suggest that specific K-ras codon 12 alterations may identify patients with a worse prognosis, who therefore must be candidates for adjuvant therapy. Based on these data and a review of the literature we advocate a prospective study for adjuvant therapy in K-ras positive NSCLC.

In **Chapter Nine** the technical aspects of Point-EXACCT with limitations and improvements have been discussed as well as the outlines for further a strategy towards early detection of lung cancer.

Samenvatting

Longkanker gaat gepaard met een hoge incidentie en mortaliteit. In het verleden verricht onderzoek naar vroegdetectie van longkanker met behulp van röntgenfoto's en sputumcytologie leidde niet tot vermindering van de mortaliteit. Tegenwoordig beschouwt men longkanker als een ziekte waarbij veranderingen in de nucleïnezuren optreden. Verschillende gebieden in het genoom bevatten kandidaatgenen die gerelateerd zijn aan het ontstaan van een longtumor. Het best gekarakteriseerd zijn mutaties in het p53 en het K-ras gen. Beiden ontstaan laat in het ontwikkelingsproces van longkanker. Nieuwe technieken voor de detectie van genetische veranderingen, zoals K-ras mutaties kunnen mogelijk een bijdrage leveren aan de vroegdetectie van longkanker.

Tot op heden zijn er reeds verschillende moleculaire methoden ontwikkeld voor de detectie van K-ras puntmutaties bij longcarcinomen. Deze methoden hebben een relatief geringe gevoeligheid en worden niet standaard toegepast in de kliniek en de biotechnologische industrie.

Vroegdetectie van K-ras mutaties in een heterogene celpopulatie zoals in sputum of bronchusspoelsels met slechts een kleine fractie tumorcellen tussen de meerderheid 'genetisch normale' cellen, eist een zeer gevoelige methode die zeer snel, specifiek, technisch eenvoudig en veilig is.

Hoofdstuk Een geeft een algemene inleiding over het onderzoek. Belangrijke aandachtspunten zijn de beschrijving van de verschillende genetische veranderingen die optreden tijdens het meerstapsproces van longkanker ontwikkeling. Een historisch overzicht over longkankerscreening wordt eveneens gepresenteerd. Verder worden de doelstellingen van de huidige studie aangegeven.

Hoofdstuk Twee behandelt de technologische ontwikkeling van een nieuwe methode, genaamd Point-EXACCT. Deze methode wordt gebruikt voor de detectie van een specifieke nucleotide variatie in een dubbelstrengs DNA sample door : a. het dubbelstrengs DNA te knippen met een exonuclease enzym dat een deel van het dubbelstrengs DNA omzet in enkelstrengs fragmenten; b. het enkelstrengs DNA te hybridiseren met i) een eerste probe die gelabeld is met biotine wat vervolgens aan een vaste matrix (streptavidine) gekoppeld kan worden en ii) een tweede probe die gelabeld is met digoxigenine, die vervolgens kan hybridiseren met het enkelstrengs DNA aangrenzend aan de gehybridiseerde eerste probe; c. het biotine-label van de eerste probe die gehybridiseerd is aan het enkelstrengs DNA vervolgens te binden aan de streptavidine; d. bij een perfecte hybridisatie tussen beide probes en het doelwit DNA verbindt een ligase- enzym beide probes; e. de geligeerde probes vervolgens te denatureren van het gehybridiseerde enkelstrengs DNA; f. de niet-gebonden gelabelde probe wordt vervolgens

weggewassen, waarna g. de gebonden digoxigenine vervolgens gedetecteerd kan worden.

Dit geeft uiteindelijk weer of een specifieke nucleotide-verandering voorkomt in een dubbelstrengs DNA fragment.

Solutie hybridisatie vormt een essentiële stap bij sequentie-analyse en sommige puntmutatie detectie methoden. In de praktijk wordt deze hybridisatie vaak belemmerd waardoor zuivering van geamplificeerde producten noodzakelijk is.

Hoofdstuk Drie beschrijft het effect van voorbehandeling van exonuclease op verschillende puntmutatie detectie methoden. Tevens worden de verschillende stappen in de Point-EXACCT procedure in detail besproken. Door gebruik van het enzym exonuclease kunnen heterozygote varianten gedetecteerd worden met behulp van fluorescentie sequentie-analyse. Door exonuclease heeft Point-EXACCT een hoge sensitiviteit en kan deze methode in potentie gebruikt worden voor de detectie van genetische veranderingen die reeds sporadisch voorkomen tussen 'genetisch normale' cellen.

Hoofdstuk Vier beschrijft de validering van de Point-EXACCT methode in een grote groep patiënten met een niet-kleincellig longcarcinoom. De resultaten van de Point-EXACCT methode worden hier vergeleken met twee sequentie-analyse methoden. De met sequencing aangetoonde mutaties zijn eveneens met Point-EXACCT gedetecteerd. Bovendien zijn er meer mutaties gevonden met Point-EXACCT dan met beide andere methoden. Tevens zijn K-ras puntmutaties aangetoond bij patiënten met een plaveiselcelcarcinoom. Dit wordt verklaard door de hoge sensitiviteit van de Point-EXACCT methode. Al met al tonen de resultaten dat Point-EXACCT op zijn minst beter is dan de beide sequentie-analyse methoden.

Hoofdstuk Vijf bestudeert de rol van het K-ras gen als vroege marker bij longkanker. Dit wordt aangetoond aan de hand van K-ras puntmutatie detectie in sputum van patiënten met een longtumor. De aanwezigheid K-ras puntmutaties is onderzocht in DNA geïsoleerd van paraffine-materiaal van zowel tumor als sputum monsters van 22 patiënten met een adenocarcinoom van de long. In meer dan de helft van de tumoren is een K-ras puntmutatie gevonden, en in 45% van de patiënten met een K-ras positieve tumor is dezelfde K-ras mutatie aangetoond in tenminste één sputum monster. Er zijn geen K-ras puntmutaties gedetecteerd in sputum van patiënten met een K-ras negatieve tumor. De tijd tussen de detectie van een K-ras puntmutatie in sputum en de uiteindelijke diagnose van longkanker varieerde tussen 1 maand en bijna 4 jaar. Uit deze studie van archief materiaal blijkt dat de Point-EXACCT methode bruikbaar is voor de detectie van K-ras puntmutaties in sputum van patiënten met een adenocarcinoom van de long. Point-EXACCT kan een belangrijke bijdrage leveren aan de vroegdetectie van longkanker aangezien K-ras puntmutaties gedetecteerd zijn in sputum waarin er met cytologisch onderzoek geen aanwijzingen voor maligniteit werden aangetroffen.

In **hoofdstuk Zes** wordt bestudeerd of K-ras puntmutaties ook voorkomen in niet-maligne bronchusepitheel. Bij 75 patiënten, die chirurgisch behandeld zijn voor een niet-kleincellig longcarcinoom, is bronchusepitheel geanalyseerd op de aanwezigheid van K-ras puntmutaties. K-ras puntmutatie detectie is zowel uitgevoerd op tumormateriaal als op normale bronchiale brushes, die verzameld zijn op enige afstand van de tumorlokatie. K-ras puntmutaties worden enkel in tumorweefsel aangetoond maar niet in het normale bronchusepitheel. Dit steunt de hypothese dat het optreden van K-ras puntmutaties specifiek gerelateerd is aan tumorvorming en dus laat in de carcinogenese optreedt.

Hoofdstuk Zeven bestudeert de toegevoegde diagnostische waarde van K-ras puntmutaties in bronchusspoelsels van patiënten verdacht voor een longtumor. Een serie bronchusspoelsels, waarvan de diagnose maligniteit met behulp van cytologie niet kon worden gesteld, is onderzocht met de Point-EXACCT methode. Deze bronchusspoelsels zijn afgenomen bij patiënten met een perifere schaduw op de röntgenfoto. Tevens is er een controle-groep bestudeerd. Puntmutatie detectie in codon 12 van het K-ras gen is uitgevoerd op bronchusspoelsels en tumormateriaal. Analyse met behulp van Point-EXACCT leverde in 21% van de bronchusspoelsels een K-ras puntmutatie op. Puntmutaties zijn niet gedetecteerd in de bronchusspoelsels van de controle-groep. De aanwezigheid van K-ras puntmutaties in bronchusspoelsels uit een kwab met een perifere schaduw op de long rechtvaardigt een curatieve ingreep. Moleculaire analyse kan dus een belangrijke bijdrage leveren aan de diagnostische bronchoscopie procedure.

Hoofdstuk Acht bepaalt de prognostische waarde van specifieke K-ras genotypen bij patiënten met een niet-kleincellig longcarcinoom. Associaties van K-ras puntmutaties met klinische kenmerken en overleving zijn bestudeerd. De overlevingscurves tonen een prognostisch significante rol van K-ras puntmutaties op de ziekte-vrije overleving en een nadelig effect van K-ras puntmutatie op de algemene overleving. Bij een verandering van de wildtype sequentie GGT (coderend voor glycine) naar GAT (coderend voor aspartaat) en ATT (coderend voor isoleucine) is een significant slechtere overleving gevonden, vergeleken met het wildtype of overige K-ras genotypen. Hierbij suggeren wij dat patiënten met een slechtere prognose geïdentificeerd kunnen worden op basis van specifieke K-ras codon 12 mutaties. Op basis van deze data en een literatuuroverzicht menen wij dat deze patiënten in aanmerking kunnen komen voor adjuvante therapie.

Hoofdstuk Negen geeft de technische aspecten van de Point-EXACCT methode weer. Mogelijke beperkingen en verbeteringen worden vervolgens bediscussieerd. Daarbij worden suggesties voor vroegdetectie van longkanker gedaan.